Populationsgenetische Untersuchungen zur Frage der Verteilung der Haptoglobintypen in Griechenland im Vergleich zu anderen europäischen und asiatischen Populationen

Georg Glowatzki

1962

Populationsgenetische Untersuchungen zur Frage der Verteilung der Haptoglobintypen in Griechenland im Vergleich zu anderen europäischen und asiatischen Populationen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

v30e3

vorgelegt von

Georg Glowatzki
aus Breslau

München 1962

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Populationsgenetische Untersuchungen zur Frage der Verteilung der Haptoglobintypen in Griechenland im Vergleich zu anderen europäischen und asiatischen Populationen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Georg Glowatzki
aus Breslau

München 1962

A. Schubert, München 5, Cornelliusstr. 21 · Telefon 22 17 77

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. K. SALLER

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1962

Einleitung

Grundlagen der Proteingenetik

Gruppenspezifische Serumproteine beim Menschen

Die Haptoglobine

Chemie

Physiologie

Genetik

Methodische Möglichkeiten der Darstellung der Haptoglobintypen zum Zwecke populationsgenetischer Untersuchungen

Populationsgenetik

Eigene Untersuchungen

Fragestellung

Untersuchungsmethoden

Elektrophorese

Statistik

Material

Ergebnisse

Phänotypen

Allelenhäufigkeiten

Durchmischung

Vergleich mit Untersuchungsergebnissen an anderen Populationen

Zusammenfassung

Literaturnachweis

Anhang

Statistische Berechnungsblätter und Tabellen

Da keine Maschine mit griechischen Buchstaben beschafft werden konnte, wurden diese mit der Hand eingesetzt.

Einleitung

Grundlagen der Projektionsmethode

Theoretische Betrachtungen zum Verfahren

Die Projektion

Chemie

Physiologie

Experte

Methodische Möglichkeiten der Darstellung der Projektionsergebnisse

Projektionsgeräte

Eigene Untersuchungen

Fragestellung

Untersuchungsmaterial

Versuchspersonen

Material

Durchführung

Bearbeitung

Ergebnisse

Übersicht

Altersabhängigkeiten

Geschlechtsunterschiede

Vergleich mit Untersuchungsergebnissen an anderen Populationen

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Anhang

Statistische Berechnungsgrundlagen und Tabellen

Die reine Bezeichnung mit optischen Buchstaben beschafft meinen Kollegen, meinen Dank mit der Hand eingesetzt.

Die Proteinforschung hat in der Anthropologie bereits vor mehreren Jahrzehnten eine besondere Bedeutung gewonnen, als MOLLISON etwa um 1910 die von UHLENHUTH für die artspezifische Differenzierung von Proteinen angewandte Präzipitinreaktion übernahm. Schon damals vertrat MOLLISON die Ansicht, daß die Proteine in ihrer Artspezifität genetisch bedingt sein müßten. Die moderne Forschung hat analytische Verfahren und trennscharfe Methoden entwickelt, mit deren Hilfe es heute möglich ist, Proteingemische zu fraktionieren. Diese Fortschritte sind in erster Linie der Ultrazentrifuge, den verschiedenen Verfahren der Elektrophorese und Chromatographie, sowie der Entwicklung immunchemischer Verfahren zu verdanken. Fast alle diese Methoden sind im wesentlichen in den beiden letzten Jahrzenten für die routinemäßige Laboratoriumsarbeit zugänglich geworden. Somit fallen auch die entscheidenden Fortschritte der Eiweißforschung erst in die allerletzten Jahre. Obwohl die Proteinforschung in erster Linie ein Aufgabengebiet der Chemie und der Biochemie ist, hat sich das wissenschaftliche Interesse ebenfalls auf die Bearbeitung genetischer Fragen und auf anthropologisch-humangenetische Problemstellungen konzentriert, angeregt durch die Ergebnisse der Bakteriengenetik, bei der das Problem der gengesteuerten Synthese von Proteinen im Vordergrund steht. Somit ist die Proteingenetik heute zu einer Grundlagenforschung geworden.

Was im folgenden über die chemischen und physikalischen Eigentümlichkeiten der Proteine berichtet wird, ist im Rahmen der vorliegenden populationsgenetischen Untersuchungen nur als kurzgefaßte Übersicht zu verstehen:

Grundlagen der Proteingenetik

Die Proteine bilden eine große, inhomogene Gruppe von organischen Verbindungen mit der Struktur von Polypeptiden, die durch hydrolysierende Agenzien in Aminosäuren gespalten werden können. Der Name Protein (griech. proteios = erstrangig) wurde 1838 von BERZELIUS in einem Brief an den holländischen Chemiker MULDER vorgeschlagen, wodurch die zentrale Rolle dieser Eiweißstoffe ange-

deutet wird: Sie sind die Grundsubstanz der Zelle und Träger aller Primärstrukturen von Zelle und Gewebe. So bilden sie zusammen mit der Desoxyribonukleinsäure die Grund- oder Skelettsubstanz der Chromosomen, sie vermitteln als Enzyme die biochemischen Reaktionen, steuern als Hormone den Stoffwechsel. Sie sind Träger biologischer Spezifität, wie sie in der Immunität, in allergischen Reaktionen und in toxischen Wirkungen zum Ausdruck kommen. Muskelkontraktion ist an Protein gebunden, Lichtempfindung wird durch einen Protein-Farbstoff-Komplex vermittelt.
Die Proteinmoleküle sind hochmolekular und außerordentlich kompliziert gebaut. Verglichen mit dem Molekulargewicht des Wassers 18 und dem der Dextrose 180 reichen die Molekulargewichte der Proteine von etwa 6 000 (Insulin) bis in die Größenordnung von Millionen.

Die Strukturmerkmale eines Proteins, die sich mit chemischen Methoden ermitteln lassen, werden als seine Primärstruktur bezeichnet. Darunter ist - dem Strukturbegriff der organischen Chemie entsprechend - die Zahl der Peptidketten des Moleküls zu verstehen, die Folge der Aminosäurereste innerhalb dieser Ketten, die als Aminosäurefrequenz bezeichnet wird, sowie die Arten und Stellen ihrer Verzweigungen, Vernetzungen und etwaiger Ringschlüsse. Durch physikalische Methoden, insbesondere die Röntgen-Strukturanalyse, zeigte sich, daß der Primärstruktur der Proteine eine Sekundärstruktur und eine Tertiärstruktur übergeordnet sind. Unter dem Begriff der Sekundärstruktur faßt man die sterische Anordnung der Peptidketten selbst und ihrer Teile (Atomdistanzen, Valenzwinkel, Grad der freien Drehbarkeit der Valenzen) zusammen. Als Tertiärstruktur schließlich, die der sekundären nahe verwandt und begrifflich nicht immer streng von dieser zu trennen ist, bezeichnet man die Art der Faltung der bereits vorgefalteten Peptidketten zum dreidimensionalen Makromolekül einer bestimmten Größe, Gestalt- und Oberflächenform. Man nimmt vielfach an, daß die Tertiärstruktur nicht aktiv von der Zelle bestimmt wird, sondern bei gegebener Aminosäurefrequenz sich als Zustand der relativ größten Stabilität von selbst einstellt.

Die Protein-Biosynthese, zu der jeder Organismus in seinen Zellen unter Verwendung von etwa 20 freien Aminosäuren befähigt ist, wird

genetisch durch Desoxyribonukleinsäure (DNS) gesteuert, indem diese die notwendige Information für die Synthese spezifischer Peptidketten in noch nicht geklärter Weise auf hochmolekulare Ribonukleinsäure (RNS) überträgt. Letztere fungiert direkt in der Proteinbiosynthese. Da die beiden soeben genannten Substanzen, DNS und RNS für die Genetik der Proteine von entscheidender Bedeutung sind, werden ihre Strukturen in der Folge kurz beschrieben:

Die Desoxyribonukleinsäure besteht aus hochpolymeren Substanzen (Molekulargewichte bis 10 Millionen), die fast nur aus vier stets wiederkehrenden Gliedern, sog. Mononukleotiden, aufgebaut sind. Jedes Mononukleotid wiederum besteht aus einem Zucker mit 5 C-Atomen (Desoxyribose), einem Molekül Phospat und einer organischen Base. Die dabei auftretenden Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin gehören zwei Typen an, den Purinen und den Pyrimidinen. Die genannten Basen sind in verschiedenen und von Fall zu Fall wechselnden Verhältnissen in der DNS vertreten, doch stets nach einer bestimmten Regel: Adenin tritt so oft wie Thymin, Guanin so oft wie Cytosin auf, die Summe der Purinbasen ist also gleich der Summe der Pyrimidinbasen. Nach dem von WATSON und CRICK im Jahre 1953 entworfenen DNS-Modell besteht diese aus zwei spiralig umeinander gewundenen Nukleotidketten (Helixstruktur), die Zucker-Phosphat-Kette außen verlaufend, die Basen nach innen gerichtet. Die Ganghöhe der Spirale beträgt 34 A, auf eine Windung kommen 10 Mononukleotide. Der Zusammenhalt der beiden Ketten wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den paarweise sich gegenüberstehenden Basen bewirkt. Bei diesen räumlichen Verhältnissen sind nur bestimmte Basenpaarungen möglich: Nur Adenin und Thymin oder Guanin und Cytosin finden gemeinsam auf einer Stufe der Spirale Platz und können die geforderten Bindungen eingehen. Auf die Frage, wie die Anordnungen von 4 Basen die Reihenfolge von 20 Aminosäuren bestimmen können, schreibt CRICK: "Wenn wir uns vorstellen, daß die Basenpaare den Punkten und Strichen des Morse-Systems entsprechen, dann enthält eine einzelne menschliche Körperzelle genügend DNS, um 1 000 Lehrbücher zu verschlüsseln".
Die Ribonukleinsäure unterscheidet sich von der Desoxyribonukleinsäure dadurch, daß sie Ribose statt Desoxyribose, und Uracil statt

Thymin (Thymin = 5-Methyluracil) enthält. In den übrigen drei Basen stimmen RNS und DNS überein. Der Basengehalt der RNS hängt ab vom Basengehalt der DNS, aus der sie entstanden ist. Was die genetische Funktion der Ribonukleinsäure betrifft, wird vermutet, daß sie eine Art Matrize liefert, an der sich die Aminosäuren anlagern und nach der spezifischen Reihenfolge der Basenpaare zu spezifischen Eiweißkörpern geformt werden.

Die Struktureigentümlichkeit der Proteine wird durch die genetische Struktur des jeweiligen Organismus determiniert, der sie synthetisiert. Hieraus ergibt sich die Vermutung, daß die Spezifität der Proteine selbst durch Strukturunterschiede der genetischen Substanz bedingt wird. In den Sequenzen der Aminosäuren und in den scheinbar regellosen aber doch genau bestimmten Formen der Proteinmoleküle muß das Geheimnis der biologischen Spezifität liegen.

Gruppenspezifische Serumproteine beim Menschen

Die Eiweißstoffe des Blutserums haben schon zu Beginn der Proteinforschung ein besonderes Interesse gefunden. Die Gründe dafür sind wahrscheinlich darin zu suchen, daß das Blut einerseits leicht zugänglich ist, und sich andererseits die im Blutserum vorhandenen Proteine nicht in einem fest gebundenen Zellverband befinden, weshalb sie relativ leicht und schonend voneinander abgetrennt, fraktioniert werden können.

Das Blutserum selbst ist keine homogene Eiweißlösung, in ihm sind vielmehr sehr viele, nach Funktion und Menge unterschiedliche Eiweißkörper vorhanden. Sie können teilweise chemisch, physikalisch, immunologisch und immunchemisch, sowie durch ihre physiologische oder pathologisch-gestörte Funktion charakterisiert werden. Schon seit längerer Zeit kennt man eine Einteilung in Albumine und Globuline. TISELIUS schlug eine Einteilung in Albumin, α-Globulin, β-Globulin und γ-Globulin vor, wobei er sich nach der Mobilität dieser Fraktionen in der Elektrophorese, der Beweglichkeit im elektrischen Feld also, orientierte. Mit der Verbesserung der Untersuchungsmethoden konnte später diese Einteilung noch sehr viel weiter differenziert werden, da immer mehr neue Eiweißkörper im Blutserum nachgewiesen wurden. Allerdings ist bisher

nur ein kleiner Teil dieser Substanzen hinreichend gut analysiert. Von den meisten weiß man nur, daß sie überhaupt vorhanden sind, ohne daß es bisher möglich gewesen wäre, sie zu identifizieren oder ihre Funktion und ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften zu klären.

Neuerdings wurde gefunden, daß auch Serumproteine in g r u p p e n - s p e z i f i s c h e n Modifikationen vorkommen. Hierzu gehören: Haptoglobine, Transferrine, Gammaglobuline, Postalbumine, Coeruloplasmin, Cholinesterasen und Albumine.

Die Haptoglobine

Gruppenspezifische Unterschiede bei den Serumproteinen konnten zuerst im Falle der Haptoglobine nachgewiesen werden, die zu den α_2-Globulinen gehören. Sie wurden im Jahre 1938 von JAYLE und POLONOVSKY entdeckt.

Chemie:

Die chemische Zusammensetzung beträgt pro 100 g Trockengewicht: 83 g Protein, 5,7 g Glucosamin und 11,3 g Galaktose-Mannose. Diese Zusammensetzung und die Löslichkeit in Perchlorsäure charakterisieren das Haptoglobin als Seromucoid. Für seine Reindarstellung sind verschiedene Verfahren angegeben worden, insbesondere von MORETTI, BOUSSIER und JAYLE; CONNELL und SMITHIES; LAURELL; STEINBUCH und PEJAUDIER.

Physiologie:

Das Haptoglobin erhielt seinen Namen aufgrund seiner physiologischen Funktion: Es besitzt ein Bindungsvermögen gegenüber Hämoglobin, mit dem es einen peroxydase-aktiven Komplex bildet. Myoglobin wird von Haptoglobin dagegen nicht gebunden. Die Nierenschwelle für das Plasmahämoglobin ist entscheidend abhängig von der Haptoglobinkonzentration im Plasma. Hämaturie setzt erst dann ein, wenn das gesamte Haptoglobin zur Bildung des Komplexes mit freien Hämoglobin verbraucht ist. Die Normalkonzentration des Haptoglobins im Serum (Plasma) hält sich in individuell weiten Grenzen. Werte zwischen 30 und 190 mg/100 ml sind noch als Normalwerte anzusprechen. Erhöhte Haptoglobinwerte (bis 1 000 mg/100 ml) finden sich häufig bei inflammatorischen, de-

generativen und neoplastischen Prozessen, bei Nephrosen, Gallengangsverschlüssen. Subnormale Haptoglobinwerte und Ahaptoglobinämien kommen seltener vor, meist bei Anämien verschiedener Genese und Lebercirrhosen. Die schon früher bei verschiedenen Krankheiten beobachteten α_1-Globulin-Vermehrungen sollen nach JAYLE im wesentlichen durch Erhöhungen des Haptoglobinspiegels bedingt sein. Männer besitzen durchschnittlich mehr Haptoglobin als Frauen. Die Haptoglobinkonzentration im Plasma kann durch Hormongaben beeinflußt werden. Der individuelle Normalwert des Haptoglobins scheint in seiner Höhe genetisch determiniert zu sein (NYMAN).

Genetik der Haptoglobine:

JAYLE hatte bereits 1955 festgestellt, daß es mindestens zwei Haptoglobinvarianten gibt, eine vermutlich nicht polymerisierte, seltener vorkommende Form, damals Typus II genannt, und eine häufigere, als Polymer aufzufassende Form, damals Typus I genannt. Mit der Zonenelektrophorese im Stärkegel gelingt es, drei verschiedene Haptoglobintypen zu differenzieren, die sich hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Mobilität und der Zahl ihrer Banden unterscheiden. Sie werden als Typus Hp 1-1 (entspricht dem Typus II von JAYLE), Hp 2-1 und Hp 2-2 (entspricht dem Typus I von JAYLE) bezeichnet. Nach einer Hypothese von SMITHIES und FORD-WALKER wird die Synthese dieser drei Typen durch ein Paar autosomaler alleler Gene kontrolliert: Hp^1 und Hp^2. Individuen mit dem Phänotypus Hp 1-1 sind somit homozygot für das Allel Hp^1, Individuen von Typus Hp 2-2 sind homozygot für das Allel Hp^2. Individuen des Typus Hp 2-1 stellen hingegen die heterozygote Form dar. Dabei kommt es nicht einfach zu einer Addition der raschen Bande vom Typus 1-1 und der langsameren Banden vom Typus 2-2, sondern zu einem abgeänderten Elektrophorese-Spektrum, in dem zwar die rasch wandernde Komponente von Hp 1-1 erkennbar ist, daneben aber mehrere Komponenten mit veränderter Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber Hp 2-2. Eine plausible Hypothese zur Deutung dieser merkwürdigen Erscheinung wurde von ALLISON entwickelt. Danach produziert das Gen Hp^1 eine einheitliche Molekülart, die sich nicht mit gleichartigen Molekülen zu höheren Aggregaten verbinden kann, wohl aber mit dem Genprodukt des Gens Hp^2. Dabei kann immer nur ein Molekül der ersten Art in einen Molekülverband eintreten.

Das Genprodukt von Hp^2 ist dagegen so beschaffen, daß die Einzelmoleküle die Tendenz zeigen, sich zu Polymeren, d.h. zu größeren Molekülverbänden zusammenzuschließen. Diese Hypothese würde die verschiedenen Fraktionen erklären, die unter dem Einfluß eines einzigen homozygoten Gens auftreten können, aber auch die Abwandlung dieser Fraktionen durch Einbeziehung eines andersartigen Genproduktes. Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge haben ebenfalls gezeigt, daß das Haptoglobin vom Typus 2-1 nicht einfach als Mischung der Haptoglobine der beiden homozygoten Typen gedeutet werden kann. Bei dieser Untersuchungsmethode ergibt sich, daß Haptoglobin vom Typus Hp 1-1 eine Sedimentationskonstante von 4,1 S besitzt, während die beiden anderen Typen nicht einheitlich sind. Die Sedimentationskonstante des Hp 2-2 beträgt rund 7,5 S, die des Typus Hp 2-1 ergibt 5,6 S und 6,4 S. Auch die in vitro-Mischung zweier Seren vom Typus Hp 1-1 und Hp 2-2 ergibt kein Elektrophoresemuster vom Typus Hp 2-1; das entstehende Muster weist sich eindeutig als Kombination der beiden ursprünglichen Typen aus.

Die drei genannten Phänotypen des Haptoglobins sind immunologisch einheitlich, unterscheiden sich jedoch von den übrigen Serumproteinen immunologisch scharf. In der Immunelektrophorese bilden die drei Haptoglobintypen die langsamste der 5 α_2-Globulinfraktionen; sie beträgt ungefähr 10 - 30 % der Gesamt-Globuline. In der freien Elektrophorese, in der Agarelektrophorese und der Papierelektrophorese zeigt das Haptoglobin die Beweglichkeit eines S-α_2-Globulins.

Das Molekulargewicht des Haptoglobins vom Typus 1-1 beträgt rund 85 000, der Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex Hp 1-1/Hb besitzt ein Molekulargewicht von etwa 155 000. Der Komplex ist equimolekular, d. h. ein Molekül des Haptoglobins vom Typus Hp 1-1 bindet ein Molekül Hämoglobin. Das Molekulargewicht des Haptoglobins vom Typus 2-2 wird mit rund 169 000 angegeben.
Was die Hämoglobinbindungsfähigkeit des Haptoglobins betrifft, so vermag der Typus Hp 1-1 durchschnittlich mehr Hämoglobin zu binden, als das Haptoglobin vom Typus 2-1. Das Letztgenannte seinerseits kann aber mehr Hämoglobin binden, als das Haptoglobin vom Typus Hp 2-2.

Neben den üblichen drei Phänotypen Hp 1-1, Hp 2-1 und Hp 2-2 werden noch weitere Elektrophoresemuster des Haptoglobinsystems beobachtet. Hier sind zunächst die Ahaptoglobinämien zu nennen. Man versteht darunter das Fehlen nachweisbaren Haptoglobins. Die Genetik und die Genese der Ahaptoglobinämie sind sehr wahrscheinlich vielfältig. Die Mehrzahl der Fälle dürfte sekundär bedingt sein, vor allem durch übermäßigen Verbrauch des Haptoglobins bei hämolytischen Prozessen. Möglicherweise existiert aber auch eine erbbedingte Form der Ahaptoglobinämie analog den bisher bekannten "Defektproteinämien" nach der Definition von BENNHOLD, wofür aber noch keine stichhaltigen Beweise vorliegen.
Eine zweite Gruppe atypischer Muster läßt sich unter den Begriff der "modifizierten Typen" zusammenfassen. Der relativ häufigste dieser modifizierten Typen ist der Typus Hp 2-1 mod.. Dem Phänotypus Hp 2-1 mod. soll die genetische Konstellation Hp^{2m}/Hp^{1} zugrunde liegen. Von GALATIUS-JENSEN ist ein modifizierter Typus Hp Ca mit verdoppelter zweiter Bande beschrieben worden, der allerdings äußerst selten ist. GIBLETT hat ein weiteres sehr seltenes Muster, den sog. Johnson-Typus beschrieben. Ob es sich bei den von BLUMBERG diagnostizierten atypischen Mustern um genetisch selbständige Formen handelt, ist nicht geklärt. Möglicherweise ist ein Teil der modifizierten Formen charakteristisch für niedrige Haptoglobinkonzentrationen. KAHLICH-KOENNER und WEIPPL geben nach neuesten Untersuchungen an, daß die Ablesbarkeit der Haptoglobintypen bei einer Konzentration von unter 40 mg-% schlecht, während unter 15 mg-% eine Typenbestimmung überhaupt nicht mehr möglich ist. Deshalb fordern sie bei Feststellung einer Ahaptoglobinämie unbedingt eine quantitative Haptoglobinbestimmung. (Hierbei hat sich besonders die Titrationsmethode nach JAYLE bewährt)

Was die Beziehungen zwischen den Haptoglobinen und dem Altersablauf betrifft, so ist zu sagen, daß der Haptoglobintypus bei Neugeborenen meist noch nicht ermittelt werden kann, er ist nur bei rund 10 % zu differenzieren. Bei der Mehrzahl der Kinder entwickelt sich dann im Laufe der ersten 6 Lebensmonate der individuelle Hp-Typus. Dabei tritt Hp 1-1 früher in Erscheinung als die Typen Hp 2-2 und Hp 2-1.

Der spezifische Haptoglobintypus bleibt dann das ganze Leben über erhalten.

Auch für die Phylogenese ergeben sich gewisse Anhaltspunkte aus dem Vergleich der menschlichen Haptoglobin-Phänotypen mit anderen Primatenspezies. Außer Homo wurden bisher folgende Spezies auf ihren Haptoglobintypus untersucht: Macaca mulatta (Rhesusaffe), Macaca radiata (Hutaffe), Macaca irus (Cynomolgus, Javaneraffe), Macaca (Lyssodes), Cercopithecus aethiops (grüne Meerkatze), Papio hamadryas (Mantelpavian), Cebus nigrivittatus (brauner Kapuziner), Pan troglodytes (Schimpanse). Allerdings haben BOYER und YOUNG nur 25 Schimpansen untersucht. Bei den genannten Primaten wurde bisher nur ein dem menschlichen Haptoglobintypus Hp 1-1 entsprechendes Muster gefunden. Ein Polymorphismus, wie er im menschlichen Haptoglobinsystem auftritt, war bei diesen Primaten bisher nicht mit Sicherheit nachweisbar. BECKMAN und CEDERMARK haben jedoch ein vom Typus Hp 1-1 etwas abweichendes Muster bei 7 von 30 Cynomolgus-Affen (Macaca irus) beobachtet, das eine angedeutete Ähnlichkeit mit dem Typus Hp 2-1 mod. besitzt. Die übrigen 23 Affen wiesen den Typus Hp 1-1 auf. Nach noch unveröffentlichten Ergebnissen von BAITSCH und STUMPF besteht immunologisch offensichtlich Verwandtschaft zwischen dem humanen Haptoglobin und dem einiger Cercopithecinen.

Methodische Möglichkeiten der Darstellung von Haptoglobintypen zum Zwecke populationsgenetischer Untersuchungen:

Da bei populationsgenetischen Untersuchungen in Bezug auf das Haptoglobinsystem bei einer möglichst großen Probandenzahl die Haptoglobinmuster bestimmt werden müssen, ist naturgemäß einer Methode der Vorzug zu geben, die gleichzeitig eine große Zahl von Bestimmungen erlaubt. Hierzu eignet sich besonders die Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES. Sie findet im Gel aus partiell hydrolysierter Kartoffelstärke statt, unter Verwendung von basischen Puffersystemen (kontinuierliches Borsäurepuffersystem nach SMITHIES mit pH 8,4; bis pH 9,4 nach GALATIUS-JENSEN. Diskontinuierliches System nach POULIK: Tris-citratpuffer pH 8,6 für Zubereitung des Gels, Borsäurepuffer pH 8,4 - 8,6 für Elektroden-Brückenpuffer. Phosphatpuffersystem in der Modifikation nach LAURELL: pH 7,5 für Gel, pH 7,0 für Brücken).

Die horizontale oder vertikale Stärkegel-Elektrophorese ist relativ unempfindlich in der technischen Durchführung. Spannung und Stromstärke können in einem weiten Bereich variiert werden. Je nach Fragestellung können unterschiedliche Puffersysteme angewandt werden. Die oben angegebenen Puffer eignen sich vorzugsweise zur qualitativen Haptoglobinbestimmung.

Nach Zubereitung des Gels (nach Vorschrift der Lieferfirma) wird die Serumprobe mit einem Filterpapierstückchen in einen Transversalschnitt des Gels eingebracht (GALATIUS-JENSEN, BAITSCH), mit einer Pipette in einen Schlitz des Gels eingefüllt (vertikale Technik nach SMITHIES) oder mit löslicher Stärke und Puffer angerührt und diese Mischung dann in das Gel eingebracht (LOEB). Der Spannungsgradient im Stärkegel beträgt 4 Volt/cm - 12 Volt/cm, je nach apparativer Anordnung.

Die Trennung der Serumproteine im Stärkegel erfolgt nach der Ladung der Moleküle, darüberhinaus zeigt das Stärkegel einen ausgeprägten Siebeffekt (Ultrafiltrationseffekt), der die Proteinmoleküle nach ihrer Größe trennt. Unter günstigen Bedingungen werden so die Serumproteine in 14 - 18 und mehr Fraktionen aufgetrennt, wozu sich besonders die vertikale Technik nach SMITHIES eignet. Die Reihenfolge der Proteine nach Stärkegel-Elektrophorese (Kathode-Anode) ist folgende: γ-Globulin, S (slow) -α_1-Globulin, Haptoglobinsystem, β-Globuline (Transferrine), F (fast) -α_2-Globulin, mehrere sog. Postalbumine, Albumin, zwei Präalbumine. Durch diese Reihenfolge unterscheidet sich das Elektrophoresemuster des Serums bei der Stärkegel-Elektrophorese deutlich vom gewohnten Bild des Musters bei der Papier-Elektrophorese.

Das Haptoglobinmuster von unhämolysiertem Serum des Typus Hp 1-1 erscheint nach Amidoschwarz-Färbung als eine einzige Bande nahe dem eisenbindenden β-Globulin (Transferrin) vom Typus Tf CC, fast mit diesem zusammenfließend. Dagegen wandert der Hp-Hb-Komplex des hämolysierten Serums im Gel wesentlich langsamer als das Transferrin. Die Haptoglobinmuster vom Typus Hp 2-1 und Hp 2-2 bilden mehrere Banden (um 5 und mehr). Ihre Ausprägung ist verschieden stark. Ebenso sind sie unterschiedlich lokalisiert, zwischen dem Transferrin und der meist sehr deutlich ausgeprägten Bande des S-α_1-Globulins.

Bei der Färbung mit Benzidin werden in der Regel nur die Banden des Hp-Hb-Komplexes und das nicht gebundene Hämoglobin sichtbar. Mit dieser Färbemethode können schon geringe Mengen des Hp-Hb-Komplexes nachgewiesen werden, auch ist die Bestimmung der Haptoglobintypen dabei einfacher als mit der Amidoschwarz-Färbung. So erhält man mit der Benzidin-Färbung noch klare Ergebnisse bei solchen Haptoglobinkonzentrationen, die auf Amidoschwarz nicht mehr ansprechen.

Die für die vorliegenden populationsgenetischen Untersuchungen angewandte Technik, Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES in der Modifikation nach BAITSCH, wird später im Kapitel "Eigene Untersuchungen" ausführlich beschrieben.

Populationsgenetik:

Untersuchungen an verschiedenen Populationen haben gezeigt, daß die Gene, die den Polymorphismus der Haptoglobine steuern, unterschiedlich verteilt sind. So besitzen rund 15 % der europäischen Durchschnittsbevölkerung ein Haptoglobinmuster ihres Serums vom Typus Hp 1-1, etwa 50 % weisen ein Muster vom Typus Hp 2-1 auf und rund 35 % besitzen ein solches vom Typus Hp 2-2. Was die Verteilung der Gene anbetrifft, so besitzt das Allel Hp^1 im Mittel eine Häufigkeit von rund 38 %. Örtlich werden aber gewisse Abweichungen von diesem Mittelwert beobachtet. Aus dem süddeutschen Raum (Südbayern, Franken, Baden-Württemberg) liegen besonders zahlreiche Untersuchungen vor, die am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität München (Direktor: Professor Dr.Dr.K.Saller) durchgeführt wurden. Weitere Untersuchungen an deutschen Populationen sind ferner aus Münster und Berlin bekannt. Darüberhinaus sind Stichprobenuntersuchungen an folgenden europäischen Gruppen vorgenommen worden: England, Frankreich, Italien, Dänemark, Norwegen, Schweden, Finnland, Österreich, Spanien, Schweiz, Jugoslawien, Tschechoslowakei. In allen diesen europäischen Stichproben zeigt das Allel Hp^1 eine durchschnittliche Häufigkeit von weniger als 40 %.

In fast allen bisher untersuchten afrikanischen Populationen hingegen tritt das Allel Hp^1 wesentlich häufiger auf, teilweise bis 70 %. Ausnahmen bilden hierbei allerdings die Buschmänner mit einer auffallend geringen Hp^1-Häufigkeit, nämlich unter 30 %, wie auch eine Stichprobe

von Kongopygmäen mit 40 % eine deutliche Abweichung zeigt.

Bei fast allen asiatischen Populationen zeigt sich eine sehr geringe Häufigkeit des Allels Hp^1. Sie beträgt bei Japanern weniger als 30 %. Außergewöhnlich selten tritt das Allel Hp^1 bei einigen Gruppen Ceylons(Tamilen, Singhalesen, Wedda) mit 14 bis 19 % auf. In Westpakistan (20 - 24 %) und in Thailand (19 - 26 %) werden ebenso wie auch bei Malayen und Chinesen (23 - 28 %) niedrige Allelenhäufigkeiten für Hp^1 gefunden.
Die Protomalayen unterscheiden sich von den eben genannten Populationen mit 47 % deutlich.

Auffallend häufig, im Unterschied zu den meisten asiatischen Gruppen, tritt das Allel Hp^1 bei den aus Ozeanien stammenden Populationen auf. So beträgt seine Häufigkeit bei Eingeborenen der Marshall-Inseln, der Tonga-Inseln, bei Bewohnern des östlichen Hochlandes von Neuguinea (Malayischer Archipel) und bei Hawaiianern sowie Hawaii-Mischlingen rund 60 %. Die Philipinos nehmen mit 44 % Häufigkeit für das Allel Hp^1 eine Zwischenstellung zwischen diesen Populationen und den Japanern ein, sie sind den Protomalayen sehr ähnlich.

Die meisten der bisher untersuchten Indianerpopulationen Mittel- und Südamerikas zeigen bemerkenswerter Weise sehr ähnliche Allelenhäufigkeiten wie die zuvor genannten ozeanischen Populationen. Einige Eskimogruppen aus Alaska gleichen sich hingegen stark den Japanern an.

Die weiße Bevölkerung Amerikas und Australiens gleicht in Bezug auf das Haptoglobinsystem im wesentlichen den europäischen Populationen.

Ahaptoglobinämien sind in europäischen Populationen bei gesunden Probanden bisher nur selten beobachtet worden, die Häufigkeit wird niedriger als 1 % geschätzt. In einzelnen afrikanischen Populationen hingegen treten sie anscheinend häufiger auf. So werden von ALLISON für eine Stichprobe aus Nigeria bis 32,3 % angegeben. Amerikanische Neger leiden anscheinend seltener an Ahaptoglobinämie; GIBLETT fand bei seinen Untersuchungen nur 4,2 %.

Für die Interpretation derartiger Häufigkeitsunterschiede hatte die klassische Rassenkunde früher im wesentlichen die Modelle der Mischung

von Rassen zur Verfügung. Man neigt heute mehr dazu, auch kausale Faktoren der sog. Mikroevolution zur Erklärung heranzuziehen, so wird vor allem das vielleicht sehr komplizierte Modell eines Netzes vielfacher Selektionsmechanismen diskutiert. Die Grundfrage ist die: Welche genetischen Faktoren und welche Umweltbedingungen führen zur Entstehung und Aufrechterhaltung eines derartigen Polymorphismus mit unterschiedlicher Allelenhäufigkeit? Für eine befriedigende Erklärung des Polymorphismus der Serumhaptoglobine und des Gleichgewichtes der unterschiedlichen Allelenhäufigkeiten in den verschiedenen Populationen stehen bisher nur sehr wenige Hypothesen zur Verfügung. Man kann annehmen, daß viele, wenn nicht alle Faktoren der Mikroevolution zur Balance eines derartigen Polymorphismus führen. Unter diesen Faktoren spielt besonders die Selektion eine Rolle. ALLISON u.a. haben eine Hypothese diskutiert, wonach vielleicht Individuen, die das Allel Hp^2 besitzen, einen Selektionsnachteil aufweisen, wenn sie an einer Krankheit leiden, die durch hämolytische Prozesse zu einem erhöhten Verbrauch von Haptoglobin führen. Der Selektionsnachteil wird wie folgt erklärt: Das Haptoglobinmolekül vom Typus Hp 2-1 und besonders das Molekül vom Typus Hp 2-2 können weniger freies Hämoglobin binden als das vom Typus Hp 1-1. Hierfür wird die Polymerisation dieser Moleküle verantwortlich gemacht. Es erscheint möglich, daß diese Unterschiede in der Hämoglobinbindungsfähigkeit eine Selektion gegen das Allel Hp^2 bedingen. Bei der Hämolyse freiwerdendes Hämoglobin wird durch Haptoglobin komplexartig gebunden, wodurch ein Verlust von Hämoglobineisen verhindert wird. Durch einen Abbau des Hp-Hb-Komplexes in der Leber oder in der Milz wird das so gebundene Hämoglobineisen wieder für den lebensnotwendigen Eisenstoffwechsel verfügbar. Eine Ausscheidung von Hämoglobin über die Niere und damit Eisenverlust tritt erst dann auf, wenn kein Haptoglobin mehr für die Komplexbildung zur Verfügung steht. Dieser Eisenverlust, besonders bei eisenarmer Ernährung, muß demnach bei den Homozygoten des Typus Hp 2-2 früher und relativ häufiger in Erscheinung treten als bei den Homozygoten des Typus Hp 1-1, die damit einen Selektionsvorteil besitzen.

SMITHIES diskutiert einen anderen Selektionsmechanismus: Nach ihm besitzen Homozygote vom Typus Hp 1-1 unter bestimmten Bedingungen

einen Selektionsnachteil. Da das Haptoglobinmolekül vom Typus Hp 1-1 wesentlich kleiner ist als die Moleküle der beiden anderen Typen, können bei pathologisch erhöhter Durchlässigkeit der Nieren für Plasmaproteine die kleineren Moleküle schneller und leichter verloren gehen. Dadurch müßten die Träger des homozygoten Allels Hp^1 früher und relativ häufiger ein Defizit an Haptoglobin aufweisen als die Heterozygoten vom Typus Hp 2-1 und die Homozygoten vom Typus Hp 2-2.
Wenn in einer Population diese beiden Selektionsmechanismen gleichzeitig zusammentreffen, müßte im Haptoglobinsystem ähnlich wie bei den Hämoglobinopathien ein Selektionsnachteil der beiden homozygoten Typen und ein Selektionsvorteil der heterozygoten Form vorliegen. Das würde die Balance des Polymorphismus aufrecht erhalten. Die bisher vorliegenden Befunde reichen allerdings zur Stützung dieser beiden Hypothesen und für eine widerspruchsfreie Interpretation der großen Häufigkeitsunterschiede der beiden Allele Hp^1 und Hp^2 in den bisher untersuchten Populationen nicht aus.

Eigene Untersuchungen

Fragestellung:

Die Verteilung der Haptoglobintypen und die Allelenhäufigkeit für Hp^1 in europäischen und außereuropäischen Populationen ist weitgehend bekannt. Da Griechenland infolge seiner geographischen Lage eine gewisse Sonderstellung im Rahmen der europäischen Populationen dadurch einnimmt, daß es in unmittelbarer Nachbarschaft asiatischer Völker liegt und auch in früheren Zeiten einige Male Einzugsgebiet solcher Populationen war, soll in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, mit Hilfe moderner statistischer Methoden die Verteilung der Haptoglobintypen und die Allelenhäufigkeit für Hp^1 für Griechenland zu untersuchen, da hierüber bisher noch keine Ergebnisse bekannt geworden sind. Außerdem sollen die Ergebnisse der Stichprobenuntersuchungen für Griechenland mit den schon bekannten anderer europäischen und asiatischen Populationen verglichen werden.

Methode

Elektrophorese:

Als Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Haptoglobintypen wurde die Elektrophorese im Stärkegel nach SMITHIES, in der Modifikation nach BAITSCH durchgeführt.

Einzelheiten der angewandten Technik:

Stärke:

Es wurde gebrauchsfertig hydrolysierte Stärke (Starch hydrolysed der Connaugh Medical Research Laboratories, Toronto) verwendet, die nach der Vorschrift von SMITHIES hergestellt wird.

Pufferlösung:

Borsäurepuffer für das Gel nach der Vorschrift von SMITHIES; nach den Angaben der Lieferfirma für die einzelnen Chargen der hydrolysierten Stärke (Connaugh) in gering unterschiedlicher Zusammensetzung (z.B.für Lot 130:0,022 M Borsäure, 0,0088 M NaOH pro Liter Aqua dest.). Konzentration nach GALATIUS-JENSEN: 0,015 M Borsaure, 0,006 M NaOH/l. Borsäurepuffer für Elektrodenkammern (Brücken): 0,220 M Borsäure, 0,044 M NaOH.
Der Brückenpuffer kann bis zu viermal verwendet werden, dabei muß nach jeder Elektrophorese umgepolt werden. Die Brückentröge des Pherographen Original Frankfurt werden mit je 700 ml Puffer gefüllt.
Im Borsäure-Puffersystem wandert das freie, durch Haptoglobin nicht gebundene Hämoglobin schneller als der Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex des Typus Hp 1-1. Wenn bei Hämolyse viel freies Hämoglobin im Serum vorhanden ist, oder ein Serum eine geringe Haptoglobinkonzentration aufweist, kann die Differenzialdiagnose besondere des Typus Hp 1-1 gegenüber der Ahaptoglobinamie dadurch erschwert werden, daß das freie Hämoglobin und der Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex sehr nahe beieinander liegen oder sogar ineinander übergehen. Eine schärfere Trennung des freien Hb vom Hp-Hb-Komplex wird durch Erhöhen des Gelpuffer-pH auf 9,5 erzielt.

POULIK verwendet für sein diskontinuierliches Puffersystem einen Triscitratpuffer mit pH 8,6 für die Zubereitung des Gels (0,076 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 0,005 M Zitronensäure), in den Brücken Borsaurepuffer: 0,3 M Borsäure und 0,06 M NaOH, pH 8,6.
ASHTON gibt folgende Zusammensetzung an: Für Brücken 1,2 g NaOH, 11,8 g Borsäure/ 1 Aqua dest., pH 8,3; für das Gel 1,6 g Zitronensäure, 6,2 g Tris/1; für die Zubereitung des Gels 90 Teile dieser Lösung gemischt mit 10 Teilen des Brückenpuffers. Freies Hämoglobin und der Hp-Hb-Komplex des Typus Hp 1-1 werden mit diesem Puffer schärfer voneinander getrennt.

Der Borsäurepuffer hat gegenüber dem diskontinuierlichen Puffersystem den Vorzug,daß in einer Bahn mehrere Proben hintereinander gelegt werden können,die alle mit annähernd gleicher Geschwindigkeit wandern.Im diskontinuierlichen System hingegen wandern die nahe der Kathode eingelegten Serumproben wesentlich schneller als die nahe der Anode liegenden.
Phosphatpuffer in der Modifikation nach LAURELL: Zur Herstellung des Gels wird Phosphatpuffer nach SOERENSEN verwendet, pH 7,5 , 0,0067 M; in den Brücken Phosphatpuffer 0,03 M , pH 7,0. In diesem Phosphatpuffersystem wandert das freie Hämoglobin nicht anodisch wie im Borsäure- und Trispuffersystem,sondern kathodisch. Der Hp-Hb-Komplex wandert dagegen anodisch.Das Phosphatpuffersystem eignet sich besonders zur Differenzialdiagnose des Typus Hp 1-1 gegenüber der Ahaptoglobinämie.Die Auftrennung der Typen Hp 2-2 und Hp 2-1 scheint aber nicht so gut wie im Borsäuresystem; ebenfalls ist das Gel bei der Zubereitung mit Phosphatpuffer etwas brüchiger.

Herstellen des Stärkegels:

Die Stärke wird in Gelpuffer aufgeschwemmt,die Mengen sind je nach der Charge der hydrolysierten Stärke etwas variabel.Sie betragen für Lot 130 der Connaugh-Stärke z.B. 13,5 g Stärke/100 ml Gelpuffer,bei GALATIUS-JENSEN 16 g/100 ml ,bei DEBRAY-SACHS 15 g/100 ml.
Die Aufschwemmung wird im Erlenmeyer-Kolben über offener Flamme unter dauerndem Schütteln gekocht.Die Masse wird dabei zunächst fest,muß aber weiter gekocht werden,bis der Stärkebrei wieder dünnerflüssig-glasig wird.Danach wird die Masse von der Flamme fortgenommen.Mit einer Wasserstrahlpumpe,die mit durchbohrtem Gummistopfen auf den Erlenmeyer-Kolben aufgesetzt wird,werden Luftblasen abgesaugt.Dann wird die mäßig viskösglasige Masse in einem flachen,etwa 1 cm hohen Plexiglas-Trog (SMITHIES, GALATIUS-JENSEN,FINE) oder nach BAITSCH in einen Trog aus PCV (in PCV-Platten eingefräste Kanäle von 28 cm Länge, 1 cm Breite und 0,8 cm Tiefe. Hersteller: Oberwerkführer KAIBLINGER,Elektrophysikalisches Institut der TH München.) ausgegossen.Sofort nach dem Ausgießen werden die Tröge abgedeckt,das Gel ist dann nach etwa 1 bis 2 Stunden gebrauchsfertig.Wenn das Gel nach der Zubereitung gut abgedeckt und die Abdeckung beschwert wird,kann es schon 12 bis 24 Stunden vor der Elektrophorese gegossen werden.Für einen Trog mit 10 Kanälen der beschriebenen Modifikation nach BAITSCH werden benötigt: 40,5 g Stärke (Lot 130 der Connaugh-Stärke) und 300 ml Gelpuffer.

Apparative Anordnung:

Für Einzelbestimmung,bis zu etwa 20, wird das kleine Elphorgerät nach GRASSMANN und HANNIG verwendet.Hierbei werden die beiden äußeren Kammern als Behälter für die Brückenpuffer benutzt.Gegen die inneren Kammern

werden sie mit einem Gummistopfen abgedichtet. Das Stärkegel wird in einen PCV-Trog mit 5 eingefrästen Kanälen eingebracht, die Verbindung zu den äußeren Kammern mit 5 Lagen Filterpapier hergestellt. Ein Stromversorgungsgerät mit Feinregelung (Hersteller: Oberwerkführer KAIBLINGER, Elektrophysikalisches Institut der TH München) liefert eine Klemmenspannung von maximal 250 Volt. Der Spannungsabfall im Gel beträgt bei der angegebenen Anordnung 5 - 6 Volt/cm , die Klemmenspannung dabei 200 V , die Stromstärke pro Kanal 3 mA . Bei diesem Stromdurchgang wird das Gel auf etwa 28 - 30° C erwärmt. Bei stärkerer Erwärmung kommt es zu Austrocknungserscheinungen, wodurch die Auftrennung verschlechtert wird. Bei dieser Anordnung beträgt die Laufzeit durchschnittlich 6 Stunden, bei geringerem Stromdurchgang entsprechend länger.

Für umfangreiche Reihenuntersuchungen hat sich die Verwendung des Pherographen Original Frankfurt (Hersteller: L. HORMUTH , Inh. W.E. VETTER, Laborapparate, Wiesloch/Baden) nach WIELAND und PFLEIDERER bewährt. Da das Gerät eine gut wirksame Kühlung besitzt, kann mit hohen Spannungen gearbeitet werden. Wir stellen aus technischen Gründen die Brückentröge auf die Kühlfläche auf, die PCV-Tröge (insgesamt 4 mit je 10 Kanälen in den Maßen wie oben angegeben) werden paarweise auf die Kanten der Brückentröge aufgesetzt. Die Klemmenspannung beträgt bei dieser Anordnung zunächst 650 Volt (Spannungsabfall im Gel 13,5 V/cm, Stromdurchgang 7,5 mA pro Gelkanal) für 20 Minuten. Dann erfolgt eine Reduktion auf 450 V Klemmenspannung (Spannungsabfall im Gel 10 V/cm , Stromdurchgang 6 mA pro Gel) Die Dauer der Elektrophorese beträgt bei dieser Anordnung 1 bis 1 1/2 Stunden.

SMITHIES sowie GALATIUS-JENSEN verwenden anodisch und kathodisch je 2 Brückentröge : Trog 1 mit reversibler Ag/AgCl-Elektrode, 10% NaCl - Lösung als Elektrodenflüssigkeit; Trog 2 mit Borsäurepuffer. Beide Tröge werden durch mehrere Lagen Filterpapier miteinander verbunden.
Die von uns gebrauchte Anordnung im Pherographen Original Frankfurt verwendet nur je einen Trog mit Platinbandelektroden und Borsäurepufferlösung.

<u>Hämolysieren und Einbringen der Serumproben in das Gel:</u>
Bei künstlich hämolysierten Proben (Bildung des Hp-Hb-Komplexes) ist die Bestimmung des Haptoglobintypus leichter als bei nicht-hämolysierten. Um das gesamte Haptoglobin mit Hämoglobin abzusättigen, gibt man Hämoglobin

im Überschuß zu (nach GALATIUS-JENSEN bis zu 300 mg/100 ml Serum;nach WIEME bis 800 mg Hb/100 ml Serum, um Interpretationsschwierigkeiten wegen der Mobilitätsinterferenz von nicht gebundenem Haptoglobin gegenüber dem Hp-Hb-Komplex auszuschalten).Da die Haptoglobinkonzentration im Serum eine große Variabilität aufweist,ist es aber doch zweckmäßig,ein allzu starkes Überhämolysieren zu vermeiden,denn durch eine zu hohe Konzentration nicht gebundenen Hämoglobins wird die Differenzialdiagnose zwischen dem Typus Hp 1-1 und einer Ahaptoglobinämie (bei Verwendung des Borsäurepuffers) erschwert.

Dann erfolgt das Eintropfen der Hämoglobinlösung in das Serum unter Schütteln.Die Proben müssen nun mindestens 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen bleiben,man kann sie aber auch 15 Minuten bei 37° C inkubieren.Mit diesem künstlich hämolysierten Serum werden dann Filterkartonplättchen SCHLEICHER-SCHÜLL 5703, Maße : 7 x 9 mm getränkt.(Die Filterkartonplättchen werden von der Firma SCHLEICHER-SCHÜLL in den angegebenen Maßen als Sonderanfertigung geliefert).Sie werden mit einer Pinzette in einen Transversalschlitz im Gel eingebracht.Der Schlitz wird mit einem Metallspatel vorgestochen.Das Filterkartonplättchen SCHLEICHER-SCHÜLL 5703 saugt eine genügende Menge von künstlich hämolysiertem Serum auf (0,03 - 0,04 ml),es bleibt dabei für das Einlegen in den Gelschlitz noch steif genug.Während der Elektrophorese gibt der Filterkarton das Serum schnell wieder ab.Bei Verwendung von Borsäure- oder Phosphatpuffer können in jeden Kanal hintereinander 3 oder 4 Proben eingelegt werden.Der Abstand beträgt 5 - 7 cm.

Herstellen des Hämoglobins:

Das Sediment von gesammeltem menschlichen Citratblut wird mehrmals mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen,dann wird mit Aqua dest. hämolysiert (1 Vol. Erythrozyten + 2 Vol. Aqua dest.). Zur Entfernung des Stromas wird die Lösung mit HCl auf pH 5,8 angesäuert.Dann wird zentrifugiert und mit NaOH auf pH 7,1 neutralisiert,danach das Präzipitat abzentrifugiert.

Schneiden und Färben der Gelstreifen:

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gelstreifen horizontal geschnitten und dann gefärbt.Die Gesamtfärbung der Proteine mit Amidoschwarz ist für die alleinige Bestimmung des Haptoglobintypus nur mehr wenig gebräuchlich.Zu diesem Zwecke wird von uns die einfachere Benzidin-Färbung benutzt,die unter Ausnutzung der Peroxydase-Aktivität den Hp-Hb-Komplex

spezifisch färbt.

Für das Schneiden des Gels verwenden wir folgende Technik: Die Gelstreifen werden aus den Kanälen der Tröge herausgehoben, indem unter sie 4 mm dicke Stäbchen aus PCV geschoben werden. Dann werden alle Gelstreifen in einem Zuge mit sehr dünnem Draht geschnitten, die obere Hälfte abgehoben und die Schnittflächen durch Bepinseln mit Benzidin gefärbt.

Durchführen der Benzidin-Färbung:
Eine Benzidintablette MERCK (Benzidin 0,05 , Bariumperoxydatum 0,20) wird in 7 - 10 ml 50% Essigsäure gelöst. Die Schnittfläche des Gelstreifens wird mit dieser Lösung pepinselt. In wenigen Sekunden werden die grünblau gefärbten Hp-Hb-Komplexe sichtbar. Unter Luftabschluß bleibt die Färbung mehrere Tage beständig, während sonst ein Abblassen innerhalb kurzer Zeit eintritt. Die beschriebene Technik ist sehr einfach durchführbar und bringt gleich gute Ergebnisse wie die übrigen, in der Literatur angegebenen, zum Teil etwas umständlicheren Färbetechniken mit Peroxydase-Reagenzien.

Färbung mit Amidoschwarz:
In 200 ml einer Lösung, die aus 5 Teilen Methanol, 1 Teil Eisessig und 5 Teilen Aqua dest. besteht, werden 2 g Amidoschwarz eingebracht. In diese Färbelösung werden die geschnittenen Gelstreifen 1 Minute eingelegt, danach mehrere Stunden entfärbt, wozu eine Lösung von 5 Teilen Methanol, 1 Teil Eisessig und 5 Teilen Aqua dest. als Entfärber benutzt wird, die mehrfach gewechselt werden sollte.

Statistik:

Die Anwendung statistischer Verfahren auf die Populationsgenetik der Haptoglobine beruht auf der Hypothese von SMITHIES und FORD-WALKER, die besagt, daß die drei Phänotypen Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2 mit drei Genotypen Hp^1/Hp^1 , Hp^1/Hp^2 , Hp^2/Hp^2 in Zusammenhang stehen. Das nachstehende Schema stellt dies dar:

Phänotypus		Genotypus
Hp 1-1	⟷	Hp^1/Hp^1
Hp 2-1	⟷	Hp^1/Hp^2
Hp 2-2	⟷	Hp^2/Hp^2

Schätzung der Populationsparameter:
Innerhalb einer Population P besitzen die drei Phänotypen Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2 des Haptoglobinsystems eine bestimmte Häufigkeit, die mit H_{11}, bzw.

H_{21}, H_{22} bezeichnet wird. Die Häufigkeit des Allels Hp^1 sei π. Bei einer Stichprobe vom Umfange N aus der Population P, in der ξ_{11} Probanden dem Typus Hp 1-1, ξ_{21} dem Typus Hp 2-1 und ξ_{22} dem Typus Hp 2-2 angehören, stellen die relativen Häufigkeiten der Phänotypen innerhalb der Stichprobe, nämlich die Größen

$$h_{11} = \frac{\xi_{11}}{N} \quad , \quad h_{21} = \frac{\xi_{21}}{N} \quad , \quad h_{22} = \frac{\xi_{22}}{N} \quad ,$$

optimale Schätzwerte für die Phänotypenhäufigkeiten H_{11}, H_{21}, H_{22} innerhalb der Population P dar. Zu einem optimalen Schätzwert p für die Häufigkeit π des Allels Hp^1 innerhalb der Population P gelangt man aufgrund der von SMITHIES und FORD-WALKER postulierten Korrespondenz zwischen Phänotypen und Genotypen nach der Methode der Genzählung:

In der Stichprobe vom Umfange N sind danach 2N Allele des Haptoglobinsystems enthalten, von denen $(2\xi_{11} + \xi_{21})$ dem Typus Hp^1 und $(2\xi_{22} + \xi_{21})$ dem Typus Hp^2 angehören. Demnach ist innerhalb der Stichprobe die relative Häufigkeit des Allels Hp^1 gleich

$$p = \frac{2\xi_{11} + \xi_{21}}{2N} = h_{11} + \frac{1}{2} h_{21} \quad . \qquad (1)$$

Dieser Wert p stellt einen optimalen Schätzwert für die Häufigkeit π des Allels Hp^1 in der Population P dar.

Führt man die entsprechende Überlegung für die gesamte Population P durch, so ergibt sich, daß aufgrund des oben erwähnten genetischen Modelles innerhalb der Population die Phänotypenhäufigkeiten die Häufigkeit π des Allels Hp^1 bestimmen, und zwar ist

$$\pi = H_{11} + \frac{1}{2} H_{21} \quad .$$

Die zur Schätzung der Allelenhäufigkeiten benutzte Methode der Genzählung verwendet nur die im genetischen Modell enthaltenen Voraussetzungen. Im allgemeinen werden jedoch Allelenhäufigkeiten unter der zusätzlichen Voraussetzung geschätzt, daß sich die Population im genetischen Gleichgewicht (Panmixie) befindet. Das bedeutet, daß innerhalb der Population zwischen Phänotypen- und Allelenhäufigkeiten die Relationen

$$H_{11} = \pi^2 \quad , \quad H_{21} = 2\pi(1-\pi) \quad , \quad H_{22} = (1-\pi)^2 \quad . \qquad (2)$$

bestehen (HARDY-WEINBERG). Es ist leicht einzusehen, daß dies gleichbedeutend damit ist, daß zwischen den Phänotypenhäufigkeiten die Relation

$$4\,H_{11}\,H_{22} - H_{21}^2 = 0 \qquad (3)$$

besteht. Da die Größe

$$K = 4\,H_{11}\,H_{22} - H_{21}^2 \qquad (4)$$

(theoretisch) jeden Wert zwischen -1 und +1 annehmen kann ($K = -1 : H_{11} = H_{22} = 0$, etwa bei totaler Selektion gegenüber homzygoten Individuen; $K = +1 : H_{11} = H_{22} = 0{,}5$, etwa bei totaler Inzucht) stellt (3) eine sehr einschneidende Bedingung dar. Bei der komplexen Struktur menschlicher Populationen ist daher a priori nicht zu erwarten, daß sie erfüllt ist.

Im Falle der Panmixie ($K = 0$) bestimmen die Allelenhäufigkeiten eindeutig die Phänotypenhäufigkeiten gemäß der Relation (2). Wenn jedoch kein genetisches Gleichgewicht vorausgesetzt wird, d. h. wenn man den Wert von K nicht apriori festlegt, so bestimmen zwar die Phänotypenhäufigkeiten aufgrund der im genetischen Modell postulierten Korrespondenz zwischen Phänotypen und Genotypen immer noch eindeutig die Allelenhäufigkeiten innerhalb der Population, die Umkehrung hiervon gilt jedoch nicht. Am einfachsten ist das durch Abzählung der unabhängigen Parameter einzusehen: Die eindeutige Kennzeichnung der Phänotypenhäufigkeiten erfordert 2 unabhängige Parameter, während für die Allelenhäufigkeiten die Angabe eines einzigen Parameters genügt. Somit kann man Schlüsse von den Allelenhäufigkeiten auf die Phänotypenhäufigkeiten nur ziehen, wenn außer der einfachen Relation $H_{11} + H_{21} + H_{22} = 1$ noch eine weitere, hiervon unabhängige Relation zwischen den Phänotypenhäufigkeiten bekannt ist. Bei Kenntnis des Wertes von K für die Population P stellt (4) eine solche Relation dar.

An Anlehnung an das Vorgehen von BERNSTEIN wird K nicht selber aus den Stichproben geschätzt, sondern der Wert eines Parameters ε, der mit K in dem Zusammenhange

$$\varepsilon = \frac{K}{4\pi(1-\pi)} = \frac{4\,H_{11}\,H_{22} - H_{21}^2}{(2\,H_{11} + H_{21})(2\,H_{22} + H_{21})} \qquad (5)$$

steht. Zusammen mit der Häufigkeit $\bar{\pi}$ des Allels Hp^1 bestimmt ε eindeutig die Phänotypenhäufigkeiten innerhalb der Population P, und zwar ist

$$H_{11} = \bar{\pi}^2 + \varepsilon\bar{\pi}(1-\bar{\pi}),\quad H_{21} = 2\bar{\pi}(1-\bar{\pi})(1-\varepsilon),\quad H_{22} = (1-\bar{\pi})^2 + \varepsilon\bar{\pi}(1-\bar{\pi})$$

(BERNSTEIN, WRIGHT). Dies stellt eine Verallgemeinerung des HARDY-WEINBERGschen Gesetzes dar, weil dieses Gesetz den speziellen Wert ε gleich 0 des Parameters ε entspricht. Dieser Parameter ε kann unter bestimmten Voraussetzungen für die gesamte genetische Struktur einer Population kennzeichnend sein und in seiner Geltung nicht ausschließlich auf das Merkmal beschränkt bleiben, das zu seiner Schätzung herangezogen wurde. Einen Schätzwert für den Parameter ε erhält man, indem man in (5) für die Populationsparameter die entsprechenden Schätzwerte einsetzt, also

$$e = \frac{4h_{11}h_{22} - h_{21}^2}{(2h_{11}+h_{21})(2h_{22}+h_{21})} \qquad (7)$$

über die Eigenschaften dieses Schätzwertes sei hier nur bemerkt, daß die zugehörige Schätzfunktion e für ε-Werte, die nicht zu weit von 0 abweichen, eine Maximum-Likelihood-Schätzung darstellt. Dabei muß allerdings vorausgesetzt werden, daß der Schätzwert p für die Allelenhäufigkeiten mit dem tatsächlichen Wert innerhalb der Population übereinstimmt: $p = \bar{\pi}$.

Ist $\varepsilon = 0$, so besitzt die Schätzfunktion e asymptotisch die Varianz $V(e) = N^{-1}$. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die Hypothese $\varepsilon = 0$ zu testen. Hierzu benutzt man die Prüfgröße

$$\chi^2 = \frac{e^2}{V(e)} = \frac{(4h_{11}h_{22} - h_{21}^2)^2 N}{(2h_{11}+h_{21})^2(2h_{22}+h_{21})^2}, \qquad (8)$$

die asymptotisch wie χ^2 von n = 1 Freiheitsgraden verteilt ist, wenn die Prüfhypothese $\varepsilon = 0$ zutrifft.

Material:

Als Untersuchungsgut standen Serumproben von insgesamt 793 gesunden Blutspendern zur Verfügung, die aus den verschiedensten griechischen Provinzen stammen. Die Zusammensetzung der Probanden, nach den einzelnen Provinzen geordnet, war folgende:

Achaia: 1 Aegäische Inseln: 27 Aetoloakarnanien: 61 Argolis: 5 Attica: 88 Doris: 5 Elis: 1 Epirus: 3 Euboea: 3 Fokis: 1 Fthiotis: 61 Jonische Inseln: 4 Kreta: 7 Kykladen: 3 Lakonien: 2 Lokris: 5 Mazedonien: 164 Messenien: 22 Pieria: 1 Pylia: 1 Saronicos Inseln: 1 Sporaden: 1 Thessalien: 280 Thrazien: 40 Viotia: 2.

4 Probanden waren im Ausland geboren, jedoch von griechischen Eltern, 2 davon in Konstantinopel (Türkei), 1 in Kleinasien (Türkei) und 1 in Rumänien. Alle 4 sind jetzt in Athen ansässig.

Die Serumproben, etwa 1 - 2 cm^2 pro Probe, waren sämtlich im Regional Blood Transfusion Centre B, General Hospital "Vasilefs Pavlos" in Athen (Direktor: Dr.med.Mïkes Paidoussis) gesammelt worden. Sie wurden bei -20°C in der Gefrierbox eingefroren und in zwei voneinander unabhängigen Stichproben per Luftfracht von Athen nach München befördert, wofür ich bereits an dieser Stelle besonders danken möchte.
Alle 793 Seren waren frei von Hämolyse.

Die beiden Stichproben wurden als "Athen 1" und "Athen 2" bezeichnet.

Athen 1 setzt sich zusammen aus 375 Seren von männlichen und 24 Seren von weiblichen Blutspendern, insgesamt also enthält die Stichprobe 399 Serumproben.

Athen 2 besteht aus 394 Serumproben männlicher Blutspender.

Ergebnisse:

Bei keinem der 793 Blutspender wurde eine Ahaptoglobinämie diagnostiziert.

Unter den Phänotypen Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2 befanden sich insgesamt 35 sog. schwache Typen, 30 von ihnen wurden dem Typus Hp 2-2, die restlichen 5 dem Typus Hp 2-1 zugeordnet. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um infolge geringer Haptoglobinkonzentration schwächer ausgebildete Elektrophoresemuster, die aber eindeutig den entsprechenden Phänotypen zugeordnet werden konnten.

4 Serumproben aus dem gesamten Untersuchungsgut, 3 davon aus der Stichprobe Athen 1 und 1 aus der Stichprobe Athen 2, ließen sich hingegen nicht in die bekannten 3 Phänotypen des Haptoglobinsystems einordnen. Sie wurden als Typus Hp 2-1 mod. diagnostiziert. Diese 4 Fälle von modifizierten Typen wurden bei der statistischen Berechnung der Allelenhäufigkeit und der Durchmischung ausgeschieden, da der im vorigen Abschnitt beschriebene Berechnungsmodus nur auf die 3 Phänotypen Hp 1-1, Hp 2-1 Hp 2-2 des Haptoglobinsystems aufgebaut ist.

Bei 13 zunächst unklaren Befunden wurden Doppelbestimmungen vorgenommen, danach konnten die entsprechenden Phänotypen klar diagnostiziert werden. Derartige Doppelbestimmungen sind deshalb notwendig, weil der Wert einer populationsgenetischen Untersuchung im Hinblick auf die Verteilung der Haptoglobintypen von der absoluten Korrektheit in der Diagnose der Elektrophoresemuster abhängt.

Verteilung der Haptoglobintypen in der Stichprobe Athen 1:

Gesamtzahl N = 399.

Verteilung der Phänotypen:

Hp 1-1: 12,0 % (48), Hp 2-1: 45,6 % (182, darunter 3 sog. schwache Typen), Hp 2-2: 41,6 % (166, darunter 16 sog. schwache Typen). 3 Haptoglobinmuster (0,8 %) wurden dem Typus Hp 2-1 mod. zugeordnet. (Bei der Berechnung ausgeschieden)

Aus dieser Verteilung der 3 Phänotypen ergibt sich eine Allelenhäufigkeit für Hp^1 von 0,3510.

Das χ^2 für die Durchmischung wurde mit 0.0304 errechnet.

Verteilung der Haptoglobintypen in der Stichprobe Athen 2:

Gesamtzahl N = 394

Verteilung der Phänotypen:

Hp 1-1: 13,0 % (51), Hp 2-1: 48,5 % (191, darunter 2 sog. schwache Typen), Hp 2-2: 38,3 % (151, darunter 14 sog. schwache Typen). 1 Haptoglobinmuster (0,2 %) wurde dem Typus Hp 2-1 mod. zugeordnet. (Bei der Berechnung ausgeschieden!)

Aus dieser Verteilung der 3 Phänotypen ergibt sich eine Allelenhäufigkeit der Hp^1 von 0.3727.

Das χ^2 für die Durchmischung wurde mit 0.6070 errechnet.

Verteilung der Haptoglobintypen in der gesamten Stichprobe Athen 1 + Athen 2:

Gesamtzahl N = 793

Verteilung der Phänotypen:

Hp 1-1: 12,5 % (99), Hp 2-1: 47,0 % (373, darunter 5 sog. schwache Typen), Hp 2-2: 40,0 % (317, darunter 30 sog. schwache Typen).

4 Haptoglobinmuster (0,5 %) wurden dem Typus Hp 2-1 mod. zugeordnet. (Bei der Berechnung ausgeschieden!)

Aus dieser Verteilung der 3 Phänotypen ergibt sich eine Allelenhäufigkeit für Hp^1 von 0.3618.

Das χ^2 für die Durchmischung wurde mit 0.4412 errechnet.

Das zeigt an, daß die Durchmischung in sämtlichen Stichproben nicht von der Erwartung bei Panmixie abwicht, d. h. es ergibt sich kein Anhalt für eine wesentliche Störung des genetischen Gleichgewichtes.

Vergleich mit Untersuchungsergebnissen aus anderen europäischen und asiatischen Populationen

Untersuchungen in Bezug auf das Haptoglobinsystem wurden bisher an europäischen Populationen besonders zahlreich durchgeführt. Hieraus ergibt sich für Europa ein relativ klares Bild über die Verteilung der Haptoglobintypen und die Allelenhäufigkeit für Hp^1.

Von asiatischen Populationen liegen wesentlich weniger Untersuchungen vor, doch ist aus dem bekannten Material die Verteilung der Haptoglobinphänotypen und die Allelenhäufigkeit für Hp^1 ersichtlich.

Afrikanische, amerikanische und australische Populationen wurden bei dem Vergleich mit der griechischen Population nicht berücksichtigt.

Europäische Populationen

Autor	Populationen	n	Hp 1-1 %	Hp 2-1 %	Hp 2-2 %	Hp 0-0 %	
BAITSCH et. al.	Jugoslawen	490	14,3	45,3	40,4	--	0.3
	Tschechen	981	14,5	44,8	40,7	--	0.3
	Österreicher	621	16,1	48,2	35,7	--	0.4
	Deutsche (Bayern)	273	19,4	54,2	26,4	--	0.4
	Deutsche (Baden-Württ.)	4673					0.3
	Deutsche (Franken)	2101					0.3
	Deutsche (Südbayern)	13627					0.3
	Deutsche (Westfalen)	201	19,9	46,7	34,4	--	0.4
BÜTLER et. al.	Schweizer	920	15,2	48,8	36,0	--	0.3
MOULLEC u. FINE	Franzosen	406	15,27	49,75	34,98	--	0.4
ALLISON et. al.	Spanier (Basken)	107	14,7	45,1	39.3	0,9	0.3
	Engländer	218	10,1	55,5	31,7	2,7	0.4
GALATIUS-JENSEN	Dänen	2046	16,03	36,71	47,26	--	0.3
TARUKOSKI	Schweden	1000	15,3	44,5	40,2	--	0.3
MÄKELÄ et. al.	Finnen	891	14,5	42,1	43,4	--	0.3
FLEISCHER u. LUNDEVALL	Norweger	1000	13,2	46,2	40,6	--	0.3
GLOWATZKI	Griechen	793	12,5	47,5*	40,0	--	0.3

* enthält 4 Individuen (0,5 %) mit mod. Typus 2-1

Asiatische Populationen

SUTTON et. al.	Inder	74	4,05	28,38	67,57	--	0.1
KIRK et. al.	Inder	219	1,8	14,6**	81,8	1,8	0.0
	Malayen	236	5,1	36,0***	58,1	0,8	0.2
	Chinesen	167	10,8	34,1	53,9	1,2	0.2
MATSUNAGA et. al.	Japaner	349	6,0	35,0	57,6	1,4	0.2

** enthält 2 Individuen (0,9 %) mit mod. Typus 2-1

***enthält 1 Individuum (0,4 %) mit mod. Typus 2-1

Wie sich aus den vorliegenden Ergebnissen ersehen läßt, liegt die Allelenhäufigkeit für Hp^1 bei europäischen Populationen im allgemeinen um 0.380. Der niedrigste Wert wurde mit 0.362 für Finnen, der höchste mit 0.465 für Bayern angegeben.

Bei asiatischen Populationen liegt nach den angeführten Ergebnissen die Allelenhäufigkeit für Hp^1 etwa um 0.18. Den niedrigsten Wert weisen Inder mit 0.09, den höchsten Chinesen mit 0.28 auf.

Aufgrund der in der vorliegenden Untersuchung errechneten Allelenhäufigkeit für Hp^1 von 0.361 für Griechen ergibt sich im Vergleich mit europäischen und asiatischen Populationen, daß die Population in Griechenland, bezogen auf das Haptoglobinsystem, keine wesentlichen Unterschiede zu den übrigen Populationen in Europa aufweist. Die unmittelbar benachbarte Population in Jugoslawien besitzt eine Allelenhäufigkeit für Hp^1 von 0.369. Es ist allerdings bemerkenswert, daß die griechische Population den niedrigsten bisher bekannten Wert von 0.361 in Europa aufweist.

Der Unterschied zu den asiatischen Populationen ist hingegen deutlich.

Eine Untersuchung der Verteilung der Haptoglobintypen innerhalb der einzelnen griechischen Provinzen und ein Vergleich untereinander wurde unterlassen, weil das Material für eine solche Untersuchung nicht ausreichend ist.

Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Häufigkeit der Haptoglobintypen in der Bevölkerung Griechenlands zu bestimmen und mit anderen europäischen und asiatischen Populationen zu vergleichen.

Nach einer im Rahmen dieser populationsgenetischen Untersuchung kurzen Besprechung der Grundlagen der Proteingenetik wurde auf die gruppenspezifischen Serumproteine beim Menschen, unter besonderer Berücksichtigung der Haptoglobine eingegangen.

Als beste methodische Möglichkeit der Darstellung der Haptoglobintypen zum Zwecke populationsgenetischer Untersuchungen wird die Elektrophorese im Stärkegel beschrieben.

Nach ausführlicher Besprechung der für die vorliegenden Untersuchungen benutzen diagnostischen Technik und der Grundlagen für die statistische Auswertung wird auf die Untersuchungsergebnisse eingegangen:

793 hämolysefreie Serumproben von gesunden Blutspendern aus den verschiedensten griechischen Provinzen wurden hinsichtlich der Verteilung der Phänotypen des Haptoglobinsystems untersucht. Die Allelenhäufigkeit für Hp^1 ergab 0.361. Die Durchmischung in sämtlichen Stichproben $\chi^2 = 0.4412$ zeigte keine Störung des genetischen Gleichgewichtes.

Der Vergleich mit anderen Populationen in Europa und Asien ergab, daß die griechische Population in Bezug auf das Haptoglobinsystem im wesentlichen mit den übrigen europäischen Populationen übereinstimmt, während sie sich von den asiatischen deutlich unterscheidet.

Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen besteht für die Anthropologie und Humangenetik darin, einen ersten Beitrag zur Verteilung der Haptoglobintypen in der Population Griechenland's geleistet zu haben.

Herrn Professor Dr. Dr. K. Saller erlaube ich mir, für die freundliche Überlassung des Themas, die liebenswürdige Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit und die Überlassung des Institutsmaterials meinen ergebensten Dank auszusprechen. Außerdem möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. H. Baitsch, Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. F. Schwarzfischer, Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. G. Ziegelmayer, sowie Herrn K. G. Liebrich für die wertvollen Ratschläge, besonders hinsichtlich der statistischen Methoden, danken.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. M. Païdoussis, Direktor des 2. Regional Blood Transfusion Centre Athen, für die freundliche Unterstützung bei der Beschaffung der Serumproben.

Literatur-Nachweis

(Blatt 1 - 5)

Literaturnachweis

ALLISON,A.C.,1958 : The genetical and clinical significance of the haptoglobins.Proc.Roy. Soc.Med.,51,641.

ALLISON,A.C., BLUMBERG,B.S., ap REES,W., 1958 : Haptoglobintypes in British,Spanish Basque and Nigerian African populations. Nature,181,824.

ALLISON,A.C., BARNICOT,N.A., 1960 : Haptoglobins and transferrins in some East African peoples.Acta gent.stat.med., 10,17.

ARENDS,T., de RODRIQUEZ,M.L.,1960 : Haptoglobin in monkeys.Nature,185,325.

ASCHHEIM,E., ZWEIFACH,B.W., 1961 : Kinetics of blood protein leakage in inflammation.Circulation,2,349.

BAITSCH,H., MEIER,G., 1959 : Zur Verteilung der Haptoglobintypen in Bayern.Blut,5,302.

BAITSCH,H., MEIER,G., SCHOELLER,L., KAHLICH-KOENNER,D.M.,1960 : Frequencies of the haptoglobin serum groups among blood donors from Austria and Germany.Nature,186,976.

BAITSCH,H., 1960 : Zur Kenntnis der Haptoglobintypen einiger Cercopithecinae.Anthrop.Anz.,24,63.

BAITSCH,H., SCHWARZFISCHER,F., ZIEGELMAYER,G., 1961 : Mutter-Kind-Untersuchungen zum forensischen Beweiswert der Haptoglobin-Serumgruppen.Münch.med.Wschr.,33,1573.

BAITSCH,H., 1961 : Die Serumproteine in ihrer Bedeutung für die Anthropologie.7.Tgg.Dtsch.Ges.für Anthropologie,Tübingen.(Bericht im Druck)

BAITSCH,H., LIEBRICH,K.G., 1961 : Die Haptoglobintypen.Blut,1/2,27/69.

BAITSCH,H., MEIER,G., PINKERTON,F.J., MERMOD,L.E., RASCH,L., 1961 : Frequencies of the haptoglobin serum groups among blood donors in Hawaii. Nature (im Druck).

BAITSCH,H., HOCEVAR,M., 1961 : Genfrequenzen der Haptoglobin-Serumgruppen von Blutspendern aus Jugoslawien. (Unveröffentlicht)

BAITSCH,H., KOUT,M., 1961 : Genfrequenzen der Haptoglobin-Serumgruppen von Blutspendern aus der Tschechoslowakei.(Unveröffentlicht)

BARNICOT,N.A., GARLICK,J.P., SINGER,R., WEINER,J.S., 1959 : Haptoglobin and transferrin variants in Bushmen and some other South African peoples.Nature,184,2042.

BARNICOT,N.A., GARLICK,J.P., ROBERTS,D.F., 1960 : Haptoglobin and transferrin inheritance in northern Nigerians.Ann.Hum.Gent.,24,171.

BEARN,A.G., FRANKLIN,E.C., 1959 : Some gentical implications of physical studies of human haptoglobins.Science, 128,596.

BECKMAN,L., MELBIN,T., 1959 : Haptoglobin types in Swedish Lapps. Acta gent.stat.med.,9,3/6.

BECKMAN,L., CEDERMARK,G., 1960 : Haptoglobin types in Macaca irus.Nature, 186,643. Acta gent.stat.med.,9,306.

BENNHOLD,H., 1956 : Kongenitale Defektdysproteinämie.Verh. Dtsch.Ges.Inn.Med.,62,657.

BERNSTEIN,F.,1930 : Untersuchungen aus der Theorie der Blutgruppen.Zschr.f.indukt.Abstamm.-u.Vererbungslehre,56,233.

BLUMBERG,B.C., ALLISON,A.C., GARRY,B., 1959 : The haptoglobins and hemoglobins of Alaskan eskimos and indians.Ann.Hum.Genet., 23,349.

BOYER,S.H., YOUNG,W.C., 1960 : β-globulin polymorphism in chimpanzees. Nature,187,1035.

BRUS,J., LEWIS,S.M., 1959 : The Haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia.Brit.J.Haemat.,5,348.

BÜTLER,R., METAXAS-BÜHLER,M., ROSIN,S., WANDREY,R., 1959 : Untersuchungen über die Haptoglobingruppen von Smithies.Schweiz.Med.Wschr.,89,1041.

BÜTLER,R., ROSIN,S., WALTER,M., 1960 : Untersuchungen über die Haptoglobingruppen nach Smithies.Schweiz.Med.Wschr.,90,347.

BURTIN,P., GRABER,P., BOUSSIER,G., JAYLE,M.F., 1954 : Etude immunochimique de l'haptoglobine. Bull.Soc.Chim.Biol.,36,1029.

CONNELL,G.E., SMITHIES,O., 1959 : Human haptoglobins:estimation and purification.Biochem.J.,72,115.

FINE,J.M., BATTISTINI,A., 1960 : Etude immunologique des haptoglobines humaines individuelles.Experientia,16,57.

FINE,J.M., LOEB,J., 1958 : Electrophorèse en gel d'amidon.Rev.Hêmat., 13,449.

FINE,J.M., WASCZENKO,E., 1958 : Preparations of transparent starch gels after electrophoresis.Nature,181,269.

FLEISCHER,E., LUNDEVALL,J., 1957 : Inheritance of serum groups.Paper read at the 4.European Congress of Haematology, Copenhagen.

GALATIUS-JENSEN,F., 1956: Investigations of the genetic mechanism of the haptoglobins with a view to the medico-legal aspects.Acta Med.Leg.Soc.,9,41.

GALATIUS-JENSEN,F., 1957: Further investigations of the genetic mechanism of the haptoglobins.Acta gent. stat.med.,7,549.

GALATIUS-JENSEN,F., 1958,: On the gentics of the haptoglobin. Acta gent.stat.med.,8,232.

GALATIUS-JENSEN,F., 1958 : Rare phenotypes in the Hp system. Acta gent.stat.med.,8,248.

GIBLETT,E.R., 1958 : Haptoglobintypes in American Negros. Nature,183,192.

GIBLETT,E.R., STEINBERG,A.G., 1960 : The inheritance of serum haptoglobin types in American Negros:evidence of a 3 rd allele Hp^{2m}.Amer.J.Human Gent.,12,160.

GRASSMANN,W., HANNIG,K., KNEDEL,M., 1951 : Dtsch.Med.Wschr., 76,333.

HARDY,G.H., 1908 : Mendelian proportions in a mixed population. Science,28,49.

HARRIS,H., ROBSON,E.B., SINISCALCO,M., 1959 : Gentics of the plasma protein variants.In: Biochemistry of Human Genetics.Ciba Foundation Symposium,Churchill Edit.,London,151.

JAYLE,M.F., CONAS,G., 1952 : Propriétés et constitution clinique de l'haptoglobine sériques.Bull.Soc.Chim.Biol.,34,65

JAYLE,M.F., BOUSSIER,G., 1955 : Les séromucoides du sang.Expos.Ann.Biochem. Med.,17,157.

JAYLE,M.F., 1939 : Thèse de Doctorat en Médicine, Paris.

JAVID,J., FISCHER,D.S., SPAET,T.H., 1959 : Inability of haptoglobin to bind myoglobin. Blood,14,683.

KAHLICH-KOENNER,D.M., WEIPPL,G., 1961 : Abhängigkeit der Haptoglobin-Typenbestimmung von der Haptoglobin-Konzentration.Klin.Wschr 19,1/25.

KIRK,R.L., LAI,L.Y.C., MAHMOOD,S., SINGH,R.B., 1960 : Haptoglobin types in South-East Asia. Nature,185,185.

KIRK,R.L., LAI,L.Y.C., HOGBEN,D.L., 1960 : The haptoglobin groups of white Australians. Med.J.Austr.,45.

LAURELL,C.B., NYMAN,M., 1957 : Studies on the serum haptoglobin level in haemoglobinaemia and its influence on renal excretion of haemoglobin.Blood,12,493.

LAURELL,C.B., 1959 : Purification and properties of different haptoglobins.Clin.Chim.Acta,4,79.

LAURELL,C.B., 1959 : Determination of the haptoglobin groups. Scand.J.Clin.Lab.Invest.,11,18.

LENZ,W., 1961 : Medizinische Genetik,Verlag Gg.Thieme/Stuttgart.1.Auflg.

LI,C.C., 1955 : Population genetics.The University of Chicago Press,Chicago.

MÄKELÄ,O., ERIKSSON,A.W., LEHTOVAARA,R., 1959 : On the inheritance of the haptoglobin serum groups.Acta genet.stat.med.,9,149.

MÄKELÄ,O., RENKONEN,O.V., SOLONEN,E., 1960 : Electrophoretic patterns of haptoglobin in apes.Nature,185,852.

MÄRKI,H.H., 1961 : Über Korrelationen zwischen Leukozyten- und Serumproteinverhalten im Blute von Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen.Schweiz.Med.wschr.,1o,294.

MATSUNAGA,E., MURAI,K., 1960 : Haptoglobin types in Japanese population. Nature,186,320.

MORETTI,J., BOUSSIER,G., JAYLE,M.F., 1958 : Nouvelle methode de purification des protéines par électrophorèse dans un gel d'amidon.Bull.Soc.Chim.Biol.,4,59.

MORTON,N.F., CHUNG,G.S., 1959 : Are the MN blood groups maintained by selection.Amer.J.Hum.Genet.,11,237.

MOULLEC,J., FINE,J.M., 1959 : Frequencies of the haptoglobin groups in 406 French blood donors.Nature,184,196.

MOULLEC,J., FINE,J.M., LINHARD,J., 1960 : Haptoglobin types in 398 blood donors from Dakar(Senegal),Nature,187,517.

NYMAN,M., 1957 : Haptoglobin in pernicious anaemia. Scand.J.Clin.Lab.Invest.,9,168.

NYMAN,M., 1958 : Über Haptoglobinbestimmung im Serum,Normalkonzentration und Verhältnis zu Smithies' Serumgruppen.Clin.Chim.Acta,3,111.

NYMAN,M., 1959 : Serum haptoglobin.Scand.J.Clin.Lab.Invest., 11,39.

NYMAN,M., 1960 : Haptoglobin.Nord.Med.,63,540.

POLONOVSKI,M., JAYLE,M.F., 1938 : Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine.C.R.Soc.biol.,129,457.

POULIK,M.D., 1957 : Starch gel electrophoresis in a discontinous system of buffers.Nature,180,1477.

POULIK,M.D., SMITHIES,O., 1958 : Comparison and combination of the starch gel and filter paper electrophoretic methods applied to human sera:Two-dimensional electrophoresis.Biochem.J.,68,636.

De RODRIQUEZ,G., ARENDS,T., 1958 : Distribution of haptoglobins in native Venezuelans.Nature,183,1465.

SALLER,K.,1957 : Lehrbuch der Anthropologie,3.Auflg., Verlag Gustav Fischer,Stuttgart,Band 1.

SCHULTZE,H.E., HEIDE,K., 1960 : Der neueste Stand der Plasmaproteinforschung.In:Mediz.Grundlagenforschung,Hgb. K.Fr.Bauer,Verlag Gg.Thieme,Stuttgart,Bd.3, 352.

SERFAS,O., SCHUBERT,A., 1960 : Zur Haptoglobin-Verteilung im Raum Berlin. Blut,6,304.

SMITHIES,O., 1955 : Zone electrophoresis in starch gels. Biochem.J.,61,629.

SMITHIES,O.,1955 : Grouped variations in the occurence of new protein components in normal human serum.Nature,175,307.

SMITHIES,O., 1959 : An improved procedure for starch gel electrophoresis:Further variations in the serum proteins of normal individuals.Biochem.J., 71,585.

SMITHIES,O., WALKER,N.F.,1955 : Genetic control of some serum proteins in normal humans.Nature,176,1265.

SMITHIES,O., WALKER,N.F., 1956 : Notation for serum protein groups and the genes controlling their inheritance.Nature, 178,694.

SUTTON,H.E., NEEL,J.V., BINSON,G., ZUELZER,W., 1956 : Serum protein differences between Africans and Caucasians.Nature,178,1287.

SUTTON,H.E., NEEL,J.V., LIVINGSTONE,F.B., BINSON,G., KUNSTADTER,P., TROMBLEY,L.E., 1959 : The frequencies of haptoglobin types in five populations.Ann.Hum.Genet.,23,175.

STEINBUCH,M., PEJAUDIER,L., 1959 : The behaviour of haptoglobin during routine fractionation.Nature,184,362.

TARUKOSKI,P.H., 1959 : Gene frequencies of haptoglobin types in a Swedish population.Nord.Med.,62,1425.

TURBA,F., ZILLIG,W., 1960 : Das Eiweißmolekül. In:Mediz.Grundlagenforschung,Hgb.K.Fr.Bauer,Verlag Gg.Thieme, Stuttgart,Bd.3,257.

TUTTLE,A.H., 1955 : Demonstration of hemoglobin-reactive substance in human serum.Science,121,701.

WEINBERG,W., 1908 : Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen.Jahresh.Verein f.vaterl.Naturk. in Württemberg,64,368.

WIELAND,Th., PFLEIDERER,G., 1957 : Neuere Anwendungen der Hochspannungselektrophorese.Angew.Chem.,69,199.

WIEME,R.J., 1959 : Studies on agar gel electrophoresis.Arscia Edit.,Brüssel.

WINZLER,R.J., : Methods of Biochemical Analysis,D.Glick Edit 2,279,Interscience Publ.,New York.

WRIGHT,S., 1950 : The genetical structure of populations. Ann.Eugen.,15,323.

T A B E L L E N

zu

Statistischen Einzelberechnungen

TABELLE 1

Allelenhäufigkeiten bei einfachem Erbgang

Stichprobe : Athen 1 Stichprobenumfang N : 396

2N : 792

A. Häufigkeiten:

		x_{11} p^2N	x_{21} $2pqN$	x_{22} q^2N	Gesamt
beob.Häufigkeiten	x :	48	182	166	396
Erwartungswerte	E :	48.790	180.419	166.790	

Hypothese der vollständigen Durchmischung:

$n = 1$; $x^2 = 0.0304$; $80\% < p < 90\%$

B. Parameter:

Allelenhäufigkeiten:

$$p = \frac{2x_{11} + x_{21}}{2N} = 0.3510$$

$$q = \frac{2x_{22} + x_{21}}{2N} = 0.6489$$

Durchmischung :

$$e = \frac{4x_{11}x_{22} - x_{21}^2}{(2x_{11} + x_{21})(2x_{22} + x_{21})} = -0.0087$$

$Ne = -3.4696$

$Ne^2 = 0.0304 = X^2$ (Kontrolle!)

C. Varianzen:

Allgemein bei beliebiger Durchmischung

TABELLE 2

Allelenhäufigkeiten bei einfachem Erbgang

Stichprobe : Athen 2 Stichprobenumfang N : 393

2N : 786

A. Häufigkeiten:

		x_{11} p^2N	x_{21} $2pqN$	x_{22} q^2N	Gesamt
beob.Häufigkeiten	x :	51	191	151	393
Erwartungswerte	E :	54.611	183.777	154.611	

Hypothese der vollständigen Durchmischung :

$n = 1 ; X^2 = 0.6070 ; \quad 30\ \% < p < 50\%$

B. Parameter :

Allelenhäufigkeiten:

$$p = \frac{2x_{11} + x_{21}}{2N} = 0.3727$$

$$q = \frac{2x_{22} + x_{21}}{2N} = 0.6272$$

Durchmischung :

$$e = \frac{4x_{11}x_{22} - x_{21}^2}{(2x_{11} + x_{21})(2x_{22} + x_{21})} = -0.0393$$

$$Ne = -15.4452$$

$$Ne^2 = 0.6070 = X^2 \quad \text{(Kontrolle)}$$

C. Varianzen:

Allgemein bei beliebiger Durchmischung

TABELLE 3

Allelenhäufigkeiten bei einfachem Erbgang

Stichprobe : Athen 1 + 2 (Gesamt) Stichprobenumfang N : 789
2N :1578

A. Häufigkeiten :

		x_{11} p^2N	x_{21} $2pqN$	x_{22} q^2N	Gesamt
beob.Häufigkeiten	x :	99	373	317	789
Erwartungswerte	E :	103.308	364.383	321.308	

Hypothese der vollständigen Durchmischung:

$n = 1 ; X^2 = 0.4412 ; \quad 50\ \% < p < 70\ \%$

B. Parameter:

Allelenhäufigkeiten:

$$p = \frac{2x_{11} + x_{21}}{2N} = 0.3618$$

$$q = \frac{2x_{22} + x_{21}}{2N} = 0.6381$$

Durchmischung:

$$e = \frac{4x_{11}x_{22} - x_{21}^2}{(2x_{11} + x_{21})(2x_{22} + x_{21})} = - 0.0236$$

$Ne = - 18.6574$

$Ne^2 = 0.4411 = X^2$ (Kontrolle)

C. Varianzen:

Allgemein bei beliebiger Durchmischung

Lebenslauf

Am 11.März 1924 wurde ich als erstes Kind des Polizei-Oberwachtmeisters Georg GLOWATZKI und seiner Ehefrau Hedwig,geb.RUSSECK, in Breslau geboren.

Von 1930 bis 1934 besuchte ich die Volksschule Nr.25 in Breslau, und von 1934 ab die Städt.Eichendorff-Oberschule ebenda,an der ich am 20.März 1942 das Reifezeugnis erwarb.

Von 1942 bis 1944 studierte ich als Soldat an den Universitäten Berlin und Würzburg insgesamt 4 Semester Humanmedizin und legte die ärztliche Vorprüfung ab.

Nach meiner Rückkehr aus Kriegsgefangenschaft 1945 war ich berufstätig,da ich den Lebensunterhalt für meine Familie selbst verdienen mußte.

1951/52 studierte ich an der Universität München 2 weitere Semester Humanmedizin,mußte dann aber aus wirtschaftlichen Gründen auf eine Fortführung des Studiums verzichten und wieder berufstätig sein.

Seit 1955 bin ich als Mitarbeiter in wissenschaftlichen Abteilungen der pharmazeutischen Industrie tätig.

1958 wurde mir von meiner Firma gestattet,mein unterbrochenes Studium an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München mit dem Hauptfach Anthropologie und Humangenetik und den Nebenfächern Paläontologie und Physiologie fortzusetzen.